

Abstract

Laminin 332 and its major cell surface receptor, $\alpha 6 \beta 4$ integrin provide the core of adhesion unit in hemidesmosomes which mediate stable anchorage of the epidermis to the underlying dermis. Genetic studies have firmly established that laminin 332 and $\alpha 6 \beta 4$ integrin are absolutely required for the integrity of epidermal-dermal junction. However, role of $\alpha \beta 1$ integrins in skin remains not fully understood. To study how keratinocyte behavior is regulated by laminin 332 and its two $\alpha \beta 1$ integrin receptors, namely $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha 3 \beta 1$, a small interfering RNA (siRNA) strategy was used to down-regulate laminin $\alpha 3$ chain, integrin $\alpha 2$ or $\alpha 3$ subunits in HaCaT keratinocytes.

The resulting phenotype reveals that down-regulation of either laminin $\alpha 3$ chain, integrin $\alpha 2$ or $\alpha 3$ subunit invariably leads to morphological alterations, compromises intercellular junctions, perturbs circumferential cortical actin and significantly enhances keratinocyte migration. In addition, knockdown of laminin $\alpha 3$ chain is associated with a prominent intracellular accumulation of laminin $\gamma 2$ chain, up-regulation of $\alpha 2 \beta 1$ integrin and fibronectin and mislocation of $\alpha 6 \beta 4$ integrin. Furthermore, adhesion assay shows that laminin $\alpha 3$ chain-deficient keratinocytes exhibit increased adhesion to collagen and fibronectin. Silencing of either integrin $\alpha 2$ or $\alpha 3$ subunit activates focal adhesion kinase (FAK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway(s). Interestingly, down-regulation integrin $\alpha 2$ subunit triggers higher proliferation rate of HaCaT keratinocytes, while silencing of integrin $\alpha 3$ subunit is compensated by up-regulation of $\alpha 2 \beta 1$ integrin, fibronectin and precursor laminin 332.

In conclusion, laminin 332, $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha 3 \beta 1$ integrins control common pathways regulating keratinocyte behavior, in particular migration. In contrast, there are also distinct cellular events induced by down-regulation of laminin $\alpha 3$ chain, integrin $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits, which implies different roles of these proteins in regulation of keratinocyte homeostasis. Possibly, $\alpha 2 \beta 1$ integrin is involved in contact inhibition, whereas $\alpha 3 \beta 1$ integrin knockdown in keratinocytes regulates important events during wound healing.

Zusammenfassung

Laminin 332 und sein wichtigster Zelloberflächen-Rezeptor, $\alpha 6 \beta 4$ Integrin, bilden die Grundlage der Adhäsions-Einheit in Hemidesmosomen und können zusammen eine stabile Bindung der Epidermis an die darunter liegende Dermis gewährleisten. Genetische Studien konnten beweisen, dass sowohl Laminin 332 als auch $\alpha 6 \beta 4$ Integrin essentiell für die Aufrechterhaltung der epidermalen-dermalen Verbindung sind. Jedoch ist die Bedeutung von $\alpha \beta 1$ Integrinen in der Haut noch nicht vollständig geklärt.

Mittels einer siRNA-Untersuchung (small interfering RNA) wurden die Laminin $\alpha 3$ Kette sowie die Integrin $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Untereinheiten herunterreguliert, um dadurch den regulatorischen Einfluss von Laminin 332 und seiner zwei $\alpha \beta 1$ Integrin-Rezeptoren, nämlich $\alpha 2 \beta 1$ und $\alpha 3 \beta 1$, auf die Verhaltensweise von Keratinozyten näher zu ermitteln. Der resultierende Phänotyp machte deutlich, dass eine Herunterregulierung sowohl der Laminin $\alpha 3$ Kette als auch der Integrin $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Untereinheiten ausnahmslos zu einer veränderten Morphologie der Zellen führte, die intrazellulären Kontakte beeinträchtigte, den Aufbau des peripheren, kortikalen Aktin störte und die Migration der Keratinozyten signifikant erhöhte. Außerdem bedingt die Defizienz der Laminin $\alpha 3$ Kette sowohl eine intrazelluläre Akkumulation der Laminin $\alpha 3$ Kette als auch eine vermehrte Expression von $\alpha 2 \beta 1$ Integrin und Fibronektin sowie eine falsche Lokalisation von $\alpha 6 \beta 4$ Integrin. Weiterhin konnte durch einen Adhäsions-Versuch gezeigt werden, dass Keratinozyten ohne die Laminin $\alpha 3$ Kette eine gesteigerte Adhäsion an Kollagen und Fibronektin aufwiesen. Die verminderte Expression der Integrin $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Untereinheiten führte zur Aktivierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) und der Extrazellulär-signal regulated Kinase (ERK). Erstaunlicherweise veranlasste die Herunterregulierung der Integrin $\alpha 2$ Untereinheit eine erhöhte Proliferationsrate, während das Ausschalten der Integrin $\alpha 3$ Untereinheit durch eine vermehrte Expression von $\alpha 2 \beta 1$ Integrin, Fibronektin und den Vorstufen von Laminin 332 kompensiert werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Laminin 332, $\alpha 2 \beta 1$ und $\alpha 3 \beta 1$ Integrinen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Verhaltensweise von Keratinozyten spielen, insbesondere bei der Migration. Hingegen kann die

Defizienz der Laminin $\alpha 3$ Kette sowie der Integrin $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Untereinheiten auch spezifische zelluläre Vorgänge beeinflussen, was darauf hindeutet, dass diese Proteine eine differenzierte Bedeutung bei der Regulierung der Keratinozyten Homeostase besitzen. Möglicherweise ist $\alpha 2\beta 1$ Integrin für die Kontakthemmung wichtig, währenddessen $\alpha 3\beta 1$ Integrin wichtige Abläufe der Wundheilung reguliert.